

# Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalofílico

Alex Armando Sáez Vega<sup>1</sup>

*Recepción: 08 de septiembre de 2004 — Aceptación: 06 de mayo de 2005*

*Se aceptan comentarios y/o discusiones al artículo*

---

## Resumen

Se evaluó el efecto de cuatro fuentes de nitrógeno sobre la actividad enzimática de proteasas alcalinas, secretadas por una cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalofílico, cultivada a diferentes concentraciones de LMF (Licor de Maíz Fermentado). El crecimiento de la cepa no es afectado por los pH de inoculación de 7,0; 8,5 y 9,5; en contraste con la actividad enzimática y producción de proteína verdadera, que tuvieron sus mejores resultados a pH inicial de 8,5. A este pH se evaluaron dos fuentes de nitrógeno orgánico (extracto de levadura y peptona) y dos inorgánicos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NaNO}_3$ ). Con la peptona se presentó la mejor actividad enzimática, a una relación molar C/N entre 1 y 2. Para el intervalo estudiado de % LMF (0,5 a 2 % p/v), la concentración del LMF no incide sobre la actividad enzimática.

**Palabras claves:** *Bacillus*, proteasas, enzimas.

## Abstract

The effect of four nitrogen sources on the enzymatic activity of alkaline proteases from a wild strain of Alkalophilic *Bacillus* sp cultivated to different concentrations from CSL (Corn Steep Liquor). was evaluated. The growth of the strain is not affected by pH of inoculation of 7,0, 8,5 and 9,5, in contrast to the enzymatic activity and true protein production, that had their better results to initial pH of 8,5. To this initial pH of 8,5; two organic nitrogen

---

<sup>1</sup> Magíster en Biotecnología, asaez@eafit.edu.co, profesor asociado, integrante del GIPAB, Universidad EAFIT.

sources (yeast extract and peptone) and two inorganic ones were evaluated ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{NaNO}_3$ ). With peptone the best enzymatic activity to a relation appeared to molar C/N between 1 and 2 was found. For the studied interval of % CSL (0,5 to 2% p/v) the concentration of the CSL does not affect the enzymatic activity.

**Key words:** *Bacillus*, proteases, enzymes.

---

## 1 Introducción

En Colombia, uno de los sustratos de bajo costo que podría utilizarse para producir proteasas es el maíz de desecho, generalmente contaminado con aflatoxinas producidas por mohos que crecen en el grano almacenado. Desafortunadamente las aflatoxinas son altamente genotóxicas para el hombre, animales y algunos microorganismos, entre los que se han reportado cepas de *Bacillus* deficientes en recombinación [1].

Se desea abordar este problema, primero usando como medio de cultivo el LMF (Sigma), con el fin de evaluar el efecto de cuatro fuentes de nitrógeno sobre la actividad enzimática de proteasas alcalinas secretadas por la cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalofílico y, en una investigación posterior, evaluar el efecto de la aflatoxina.

Las proteasas son endopeptidasas que actúan sobre las proteínas hidrolizando enlaces peptídicos; éstas pueden ser: metaloproteasas que trabajan a pH óptimo de 7,0; esterasas, enzimas con alta actividad esterolítica y baja actividad proteolítica y serin-proteasas (proteasas alcalinas), que tienen residuo serina en/o cerca al sitio activo. Desde 1967 se conoce que las cepas de *Bacillus* que crecen a pH por encima de 10, sintetizan enzimas que presentan alta actividad proteolítica, son activas y estables a pH hasta 12, temperaturas relativamente altas y poseen puntos isoelectricos extremadamente básicos. Son enzimas extracelulares, estabilizadas por el ión  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 3], exhiben su actividad óptima a pH entre 9 y 11. Estas proteasas se utilizan como aditivos para jabones y detergentes, así como en diversas industrias, como la tenería y textiles. El trabajo está dirigido a evaluar una cepa de *Bacillus* que ha mostrado gran potencial en la producción de este tipo de enzimas. Entre las cepas de *Bacillus*, las proteasas alcalinas más importantes son las del tipo serina,

dentro de las que se encuentran las llamadas Subtilisinas, siendo las producidas por *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* las más estudiadas en el área industrial [4, 5, 6, 7].

Dado que la máxima producción de proteasas alcalinas se da durante la esporulación, se deben revisar los principales factores que la afectan. Según Donellan, la esporulación óptima para una especie de *B. subtilis* y un medio sintético químicamente definido, ocurre cuando la glucosa y el ácido glutámico están a concentraciones de 10 mM y en el medio se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Se sabe además, que algunos aminoácidos (fuente de nitrógeno) inhiben la producción de proteasas alcalinas y otros la potencian porque afectan la esporulación de la bacteria [2, 8, 9, 10].

## 2 Materiales y métodos

Se utilizó la cepa nativa 5A7.1 de *Bacillus* sp Alcalofílico, aislada por Montoya en 1997, en suelo con pH 8,6 del occidente colombiano [11, 12].

### 2.1 Adaptación de la cepa a diferentes pH

La cepa liofilizada se inocula en LB a pH 7,0 en un volumen de 10 ml con agitación a 200 *rpm*, 12 horas, a 30°C. La cepa se adecuaba a diferentes pH en medio LMF.

### 2.2 Curvas de crecimiento y producto en LMF a diferentes pH iniciales

Se inoculó la bacteria previamente ambientada a pH iniciales de 7,0; 8,5 y 9,5 en LMF 0,5 % grado comercial (Sigma), elaborado a los tres pH mencionados; se incuban a las mismas condiciones y se resiembran a las 12 horas para elaborar el inóculo final, del cual se inoculó 10 % a todas las muestras de distintos pH. El medio comercial se diluye a 0,5 % con agua desionizada y su pH se ajustó a 7,0; 8,5 y 9,5 según los requerimientos del experimento; posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 minutos a 15 psi.

Para determinar el efecto del pH de inoculación sobre la cinética de crecimiento, actividad enzimática y producción de proteína verdadera, se reali-

zaron los tratamientos por triplicado y se tomaron muestras a tiempos entre 0 y 48 horas, a intervalos de 2 y 4 horas; se centrifugaron a 4°C, 5000 *rpm* durante 30 minutos. El crecimiento celular se cuantificó a 400 *nm* [11]. La agitación se realizó en un shaker a 200 *rpm* y a temperatura constante de 30°C.

La actividad enzimática se determinó usando el sobrenadante de la fermentación mediante el método de Delft [13], modificado por Montoya (1997); la actividad se da en unidades Delft por gramo (ADU/g) [11]. La proteína verdadera del sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry [14].

### 2.3 Efecto del nitrógeno sobre la actividad enzimática

Para evaluar el efecto de cuatro fuentes de nitrógeno, se determinó la actividad enzimática en ADU/g, usando como medio LMF. La concentración de nitrógeno se ajustó a relaciones molares Carbono/Nitrógeno (C/N) entre 1 y 5, con intervalos de 0,5 para todas las fuentes de nitrógeno. Se tiene en cuenta que el LMF contiene una composición conocida de carbono reducido. Con base en esto se calcula la cantidad de nitrógeno que se debe agregar de cada fuente para obtener las mencionadas relaciones C/N, siendo las fuentes orgánicas: peptona y extracto de levadura, y las inorgánicas: Cloruro de Amonio y Nitrato de Sodio.

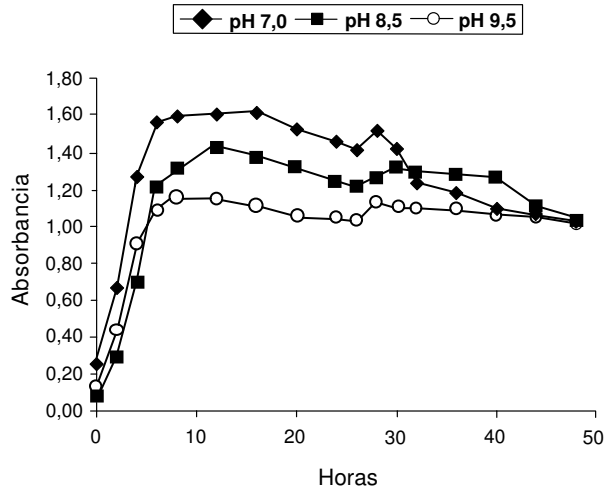
El efecto del nitrógeno fue evaluado a cuatro concentraciones de LMF (0,5; 1,0; 1,5 y 2 % p/v) y a pH y tiempos que mostraron mejor actividad enzimática. Las diferencias entre los tratamientos, teniendo en cuenta las comparaciones entre las relaciones molares C/N, fueron estimadas mediante análisis de varianza con un  $\alpha = 0,05$ .

## 3 Resultados y discusión

### 3.1 Efecto del pH inicial en el crecimiento, actividad enzimática y producción de proteína verdadera

El crecimiento observado en la figura (1), indica que en LMF 0,5 % no se ve afectado por el pH de inoculación, lo cual se corrobora con el análisis de varianza correspondiente ( $F_0 = 2,96219233$ , menor que el  $F$  crítico = 3,19072058).

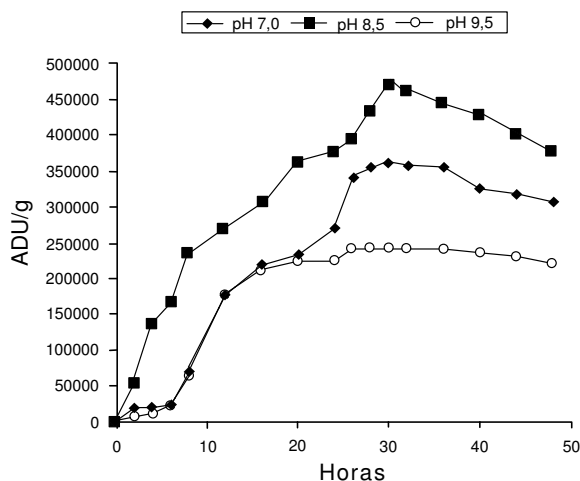
Estos resultados coinciden con los reportados por Montoya (1997) para esta misma cepa, con los mismos pH, en el medio LB [11].



**Figura 1:** Efecto del pH inicial sobre el crecimiento de la cepa 5A7.1 en LMF 0,5

En contraste, la actividad enzimática ( $F_0 = 5,4737$ , mayor que el  $F$  crítico = 3,1907) y la proteína verdadera ( $F_0 = 4,7409$ , mayor que el  $F$  crítico = 3,1907) se ven influenciadas por un valor del pH inicial igual a 8,5; lo cual se ilustra en las figuras (2) y (3). En 1997, Montoya encontró la mejor actividad para esta misma cepa, en medio LB a pH 9,5; la actividad presentada en LMF a pH 8,5 podría reducir los tiempos de adaptación del microorganismo, dado que no habría que incrementar el pH a la cepa, paulatinamente, hasta llegar a 9,5 [11].

La mayor actividad enzimática y proteína verdadera se alcanzan a un intervalo de tiempo entre 24 y 36 horas y muestran cinéticas similares. Esto sugiere que el aumento en la actividad enzimática es consecuencia de una mayor producción de proteasas alcalinas, lo cual se ve reflejado en el aumento de la proteína verdadera. Se obtuvo la mayor producción enzimática seis horas antes de lo reportado en LMF por algunos autores, lo que indica que la cepa en estudio es promisorio. De igual manera, Montoya (1997), para medio LB y la cepa 5A7.1, reporta un tiempo de 30 horas, lo que muestra la potencialidad del LMF (ver figuras 2 y 3) [4, 11].



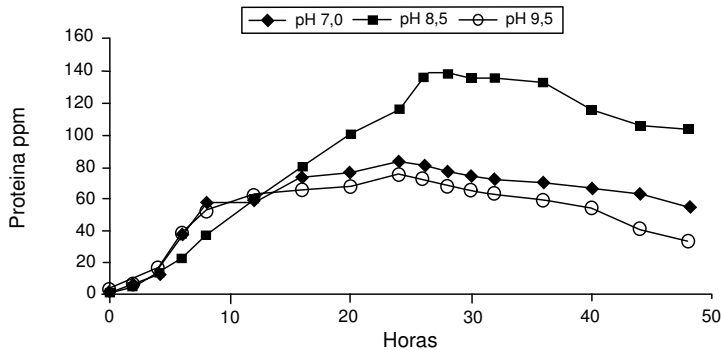
**Figura 2:** Efecto del pH inicial sobre la actividad enzimática en LMF 0,5 %

Dado que el valor de pH inicial en el cual se registró la mayor actividad enzimática fue de 8,5, los análisis posteriores se realizaron a este valor.

### 3.2 Efecto del nitrógeno sobre la actividad enzimática a diferentes concentraciones de LMF, con cuatro fuentes de nitrógeno a pH inicial de 8,5

De la inspección de la figura (4), se observa que la adición de las fuentes de nitrógeno, peptona, extracto de levadura y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al medio de cultivo LMF, incrementó la actividad enzimática con respecto al control. En contraste, cuando se utilizó nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, la actividad enzimática disminuyó notablemente, alcanzando valores incluso por debajo del control, lo cual sugiere que el nitrato de sodio puede resultar inhibitorio de la actividad enzimática.

Se observa también que el máximo de actividad se encuentra en las relaciones C/N entre 1 y 2 para peptona, extracto de levadura y cloruro de amonio. Todas son estimuladoras, exceptuando el nitrato, lo que permite concluir que los mayores valores de actividad se dan en ese intervalo. Se corrobora, en parte, la afirmación de Avignone (1990)[15], quien sugiere que las mejores



**Figura 3:** Efecto del pH sobre la producción de proteína verdadera en LMF 0,5 %

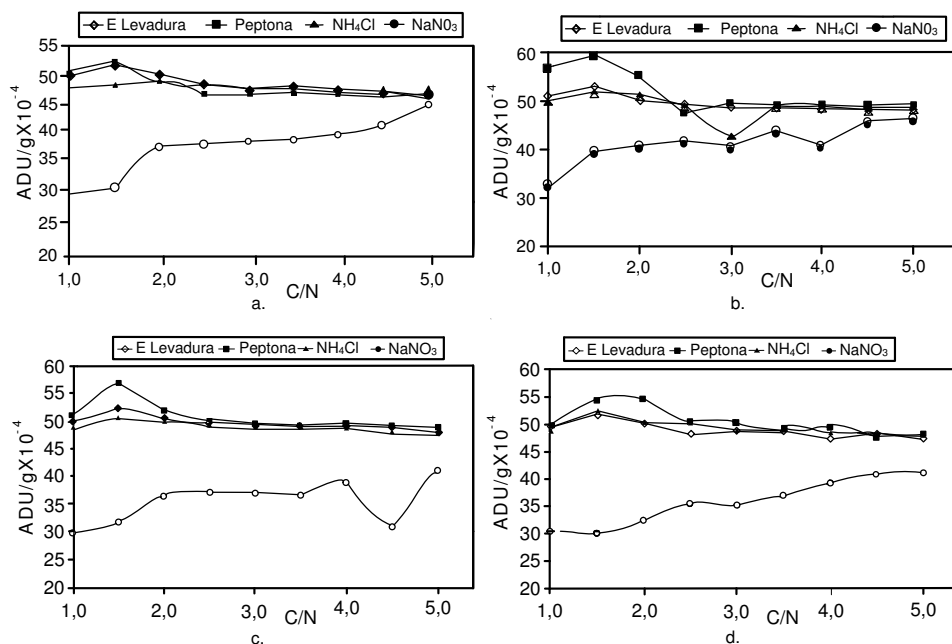
actividades enzimáticas para especies de *Bacillus* se obtienen en el intervalo de relaciones C/N entre 1 y 5.

Los resultados indican que las fuentes orgánicas evaluadas y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pueden ser utilizadas como suplementos de LMF para lograr una mayor actividad enzimática. Sin embargo, a escala industrial esta alternativa podría resultar bastante costosa y poco práctica; por esta razón, el LMF sin suplemento y a las diferentes concentraciones evaluadas, constituye una buena fuente para obtener proteasas alcalinas con una actividad enzimática aceptable (controles = 473002, 484321, 478679 y 477684 ADU/g). Comparada con la Subtilisina comercial Carlsber (523700 ADU/g), es una alternativa que conviene explorar desde el punto de vista técnico-económico, teniendo en cuenta además que el % LMF no es significativo a los porcentajes evaluados.

## 4 Conclusiones

El crecimiento de la cepa nativa de *Bacillus alcalofílico* 5A7.1 en LMF comercial, no se ve afectado por los pH iniciales de 7,0; 8,5 y 9,5, pero estos sí ejercen un efecto importante sobre la actividad enzimática y producción de proteína total, presentando mejores resultados a pH 8,5.

En LMF comercial sin suplemento de nitrógeno (controles), se encontraron valores de actividad enzimática cercanos a los comerciales (controles = 473002, 484321, 478679 y 477684 ADU/g. Promedio 478421 ADU/g). Comparado



**Figura 4:** Efecto del nitrógeno sobre la actividad enzimática a diferentes relaciones C/N aparentes y un pH inicial de 8,5 para: a) LMF 0,5 %, b) LMF 1,0 %, c) LMF 1,5 % y d) LMF 2,0 %

con la Subtilisina comercial Carlsber (523700 ADU/g), es una alternativa que conviene explorar desde el punto de vista técnico-económico, teniendo en cuenta, además, que el % LMF no es significativo a los porcentajes evaluados.

Se encontraron dos efectos del nitrógeno sobre la actividad proteásica de la cepa nativa. Uno estimulador, en el caso de las fuentes orgánicas de nitrógeno (peptona y extracto de levadura) y el NH<sub>4</sub>Cl, y otro inhibitorio, en el caso de nitrato de sodio. Cabe resaltar que la actividad en la fuente NH<sub>4</sub>Cl es promisorio, dado que es una fuente más barata que las orgánicas y sólo habría de establecerse una relación costo beneficio para definir si es viable desde el punto de vista económico.

Los mejores valores de actividad enzimática del *Bacillus* sp 5A7.1 en LMF, se obtienen a cualquier porcentaje entre 0,5 y 2 % de LMF; peptona como fuente de nitrógeno a un intervalo de relación C/N entre 1 y 2; pH inicial de



8,5; temperatura 30°C y agitación de 200 *rpm*. Los valores encontrados están dentro del intervalo de actividades reportadas para las enzimas comerciales, como la Subtilisina Carlsber, que presenta un valor de actividad de 523700 ADU/g.

## Referencias

- [1] K. Uraguchi y M. Yamazaki. *Toxicology, Biochemistry and pathology of Mycology*. Ed. Japón, John Wiley & Son, Japón, 1978.
- [2] D. Pérez et al. *Ciencias Biológicas*. **17**, Cuba, 1987.
- [3] A. Simoncini. *Subtilinases production. J. Of American Leather Chemistry Association*. **82**, 1987.
- [4] Knud Aunstrup et al. *Alkaline proteases produced by a bacillus*. Patente US 03674643, 1972.
- [5] T. Christianson et al. *Alkaline proteases variants with increases stability*. US Patent. 5340735, 1994.
- [6] R. Harwood Colin. *Bacillus*. New York: Plenum Press, ISBN 0-306-43137-8, 1989.
- [7] N. Fujiwara y K. Yamamoto *Production of alkaline protease in a low-cost medium by Alkalophilic Bacillus sp*. J. Ferment. Technol. **63**(3), 1987.
- [8] J. E. Donnellan. *Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of Bacillus subtilis*. J. Bacteriology. **87**(2), 1964.
- [9] J. L. Doering y K.F. Bott. *Diferential aminoacids requirements for sporulations in B. subtilis*. J. Bacteriol. **112**(1), 1972.
- [10] S. Moon y S. Parulekar. *A parametric study of a protease production in batch culture of Bacillus firmus*. J. Biotech. and Bioeng. **41**(1), 1993.
- [11] Olga Inés Montoya. *Aislamiento de cepas nativas de Bacillus sp. Alcalofílicas y obtención de proteasas alcalinas*. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fé de Bogotá, 1997.
- [12] G. Giraldo y A. Gómez. *Selección del mejor medio de cultivo para la obtención de proteasas alcalinas de la cepa nativa Bacillus sp. Alcalofílico*. Tesis, Universidad de Antioquia, Medellín, 1999.
- [13] A. Van Velzen. *Determination of alkaline protease activity*. US Patent. 1353317, 1976.

- [14] O. H. Lowry, A. L. Rosebrough et al. *Protein measurement with the Folin phenol, reagent*. J. Biol. Chem. 193, 1951.
- [15] R. C. Avignone y O. Yantorno. *Organic and Inorganic Nitrogen sources ratio effects on Bt*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 6, 1990.
- [16] Leo Goldblatt. *Aflatoxins (Serie: Food science and Technology)*. New York: Academic Press, 1969.